

(3x)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
DEM GEBIET DES PATENTWEISSES**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  <b>H 28045PC</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>  siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5		
Internationales Aktenzeichen  <b>PCT/EP 99/ 10333</b>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 66%;">Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)  22/12/1999</td> <td style="width: 33%;">(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  23/12/1998</td> </tr> </table>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)  22/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  23/12/1998
Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)  22/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  23/12/1998		
Anmelder  <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG</b>			

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.  
 Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
  - Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
  - in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
  - zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
  - bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
  - bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
  - Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
  - Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

**INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/ 10333

**Feld III****WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)**

nach Zeile 3 bitte folgenden Text hinzufügen:

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die Verknüpfung von zwei oder mehreren Testergebnissen auf molekularer Ebene im Sinne der Bool'schen Verkettung einen qualitativ sehr guten, einfachen und kostengünstigen Analytentest erlaubt, wobei sich die verschiedenen Testergebnisse untereinander nicht im wesentlichen stören.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 99/10333

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7	G01N33/58	G01N33/542	G01N33/53	G01N33/543	C12Q1/68
-------	-----------	------------	-----------	------------	----------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 18866 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 29. Oktober 1992 (1992-10-29)	25-36
A	das ganze Dokument ----	1-24
X	WO 98 23956 A (UNIV LONDON ; TEDDER RICHARD SETON (GB)) 4. Juni 1998 (1998-06-04)	25, 26, 28, 32-36
A	das ganze Dokument -----	1-24



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

6. Juni 2000

11/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

EP 99/10333

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9218866	A 29-10-1992	AU CA EP FI JP NO US	1911592 A 2107899 A 0579767 A 934438 A 6507021 T 933582 A 5851776 A	17-11-1992 11-10-1992 26-01-1994 04-11-1993 04-08-1994 10-12-1993 22-12-1998
WO 9823956	A 04-06-1998	NONE		

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BÖSL, Raphael  
 Bardehle, Pagenberg, Dost,  
 Altenburg, Geissler, Isnbruck  
 Galileiplatz 1  
 D-81679 München  
 ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 20 December 2000 (20.12.00)	
Applicant's or agent's file reference H 28045PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP99/10333	International filing date (day/month/year) 22 December 1999 (22.12.99)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative				
Name and Address  WAGNER, Thomas Römerstrasse 18 D-65719 Hofheim Germany	State of Nationality DE		State of Residence DE	
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence				
Name and Address  WAGNER, Thomas Sonnenbühlstrasse 73 78464 Konstanz Germany	State of Nationality DE		State of Residence DE	
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:				

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  N. Wagner Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

REC'D 28 NOV 2000

IPO PCT

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts H28045PC Bö/sa	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 22/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 23/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/58		
Anmelder AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO...et al.		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfasst insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.</p>
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I   <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II   <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III   <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV   <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V   <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI   <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII   <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII   <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>

Datum der Einreichung des Antrags 11/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Hoesel, H Tel. Nr. +49 89 2399 8693



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-13                    ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-36                    eingegangen am                    31/10/2000 mit Schreiben vom            30/10/2000

**Zeichnungen, Blätter:**

1/5-5/5                    ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 36
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1 - 24
	Nein: Ansprüche 25 - 36
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 36
	Nein: Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-5,635,352

D2: WO-A-98/23956

**SEKTION V:**

1. Aufgrund der Klarstellung, daß die "Marker" zu analysierende Bestandteile der Probe darstellen, sind die in den unabhängigen Ansprüchen 1 und 2 dargelegten Verfahren neu gegenüber Testmethoden, die die Bestimmung **eines einzigen Analyten** unter Verwendung eines mehrfach indirekten Nachweises beinhalten (siehe D1, und Sektion VIII, Punkt 4).

Die anspruchsgemäßen Merkmale lassen sich zudem nicht in naheliegender Weise aus dem Stand der Technik gemäß des Recherchenberichts ableiten.

Das Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 24 scheint somit neu zu sein und auf erfinderischer Tätigkeit zu beruhen, und somit die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT zu erfüllen.

2. Anspruch 25 richtet sich auf Testkits, die (mindestens) zwei Erkennungsspezies zur Bindung zweier verschiedener Analyte ("Marker") unter Komplexbildung enthalten, wobei zwei der Bindungsspezies unterschiedlich markiert sind.

Im Gegensatz zu den Ansprüchen 1 und 2 geht aus dem Anspruchwortlaut nicht hervor, welche funktionale Beziehung zwischen den verschiedenen Markern und Erkennungsspezies besteht, z.B. ob jeweils getrennte Komplexe ( $e_1 \times m_1$  bzw.  $e_2 \times m_2$ ) oder ein alle Bestandteile enthaltender Komplex gebildet wird.

Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyte unter Verwendung von für die jeweiligen Analyte spezifische, und voneinander unterscheidbare Erkennungsreagenzien, sind aus dem Stand der Technik bekannt (s. D2, S. 1, Z. 25 - 28, S. 2, Z. 13 - 26 und S. 4, Z. 21 - 23). Der Fachmann würde die Zusammensetzung der dafür notwendigen Reagenzien, insbesondere der Erkennungsspezies in Form von Testkits als naheliegende Maßnahme erachten. Derartige Kits

würden in den Schutzbereich der vorliegenden, breiten Ansprüche 25 und 26 fallen.

Die genannten Ansprüche erfüllen somit nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT (siehe auch Sektion VIII, Punkt 5).

Der Einwand bezieht sich gleichermaßen auf die abhängigen Ansprüche 28, 32 und 33, deren Merkmale in D2 vorbeschrieben sind, sowie auf die Ansprüche 34 - 36, die sich auf die konventionelle Verwendung des naheliegenden Testsystems in bekannten Testverfahren (die gemäß Anspruchswortlaut nicht mit den in Anspruch 1 und 2 genannten Verfahren identisch sein müssen) richten.

3. Die Merkmale der abhängigen Ansprüche 27, 29 - 31 sind aus D2 nicht ableitbar. Berücksichtigung dieser Merkmale in den übergeordneten Ansprüchen führt jedoch nicht zu einem Produkt, das speziell für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angepaßt wäre, und die vorgegebene Aufgabenstellung lösen könnte.

Die obengenannten Ansprüche genügen somit nicht den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT (siehe auch Sektion VIII, Punkt 6).

#### **SEKTION VIII:**

4. Laut Anspruch 1 stellen die als Marker bezeichneten Assaykomponenten zu analysierende Substanzen z.B. in einer klinischen Probe dar. Als solche liegen "Marker" oder genauer ausgedrückt "Analyte" **grundsätzlich in unmarkierter Form und in unbekannter Konzentration** vor. Den beiden vorliegenden Arbeitsbeispielen liegt jedoch die Bestimmung **einer einzigen unmarkierten, und somit als Analyt anzusehenden Substanz** zugrunde. Die Arbeitsbeispiele fallen somit nicht in den Schutzbereich der vorliegenden Ansprüche. Hinsichtlich der verwendeten Reagenzien (die als "Marker 2" bezeichnete Substanz wurde als Fluoreszein-markiertes Derivat und in vorgegebener Konzentration zugesetzt) beschreiben die Beispiele ein Verfahren zur Bestimmung **eines einzigen Analyten** unter Verwendung von mehrfach indirekter Markierung.

Es liegt somit ein Widerspruch zwischen dem experimentellen Teil der Beschreibung und dem Anspruchsgegenstand vor. Die Anmeldung genügt somit nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT.

Verfahren unter Verwendung mehrfach indirekter Markierung und Signalamplifikation sind in D1 vorbeschrieben. Sollte der Begriff "Marker" dahingehend ausgelegt werden, daß er in vorgegebener Menge zugesetzte, und insbesondere markierte Reagenzien umfaßt, deren Funktion genauer mit dem Begriff "Erkennungsspezies" umschrieben wäre, ergäbe sich ein Einwand wegen fehlender Neuheit gegenüber D1:

Gemäß der beiden vorliegenden Arbeitsbeispiele ist das als "m2" bezeichnete Reagenz kein Analyt, sondern dient als Detektionsmittel, und ist somit hinsichtlich seiner Signalfunktion und Lokalisation im resultierenden Reaktionskomplex als vierte Erkennungsspezies "e4", aufzufassen. Es hat damit identische Funktion wie die Label probe "LP" gemäß der Figuren 7, 8 und 12 in D1.

5. Im Gegensatz zum Verfahren in Anspruch 1 sind im Verfahren gemäß Anspruch 2 **ohne Auswahl spezifischer Markierunggruppen und -technologien** Teilkomplexe, die nur jeweils einen der (unmarkierten) Analyte enthalten (und somit nicht als positiv auszuwerten wären) nicht von "vollständigen" Komplexen der Konformation  $e1 \times m1 \times e2 \times e3 \times m2$  unterscheidbar.

Anspruch 2 scheint somit nicht alle für die erfolgreiche Umsetzung des Verfahrens notwendigen Verfahrensmerkmale und -anpassungen zu enthalten. Er entspricht somit nicht den Erfordernissen von Art. 6 PCT.

6. Im Gegensatz zu den Ansprüchen 1 und 2 enthalten die Kitansprüche 25 und 26 keinerlei Spezifikationen hinsichtlich der Wechselbeziehung der Erkennungsspezies mit den verschiedenen Markersubstanzen. Die demgemäß beanspruchten Testkits sind somit nicht erkennbar speziell für die erfindungsgemäß verfahren angepaßt (siehe auch Sektion V, Punkt 2 und 3).

Die spezielle Wechselbeziehung der beiden Erkennungsspezies mit den übrigen Assaykomponenten, die in der Ausbildung eines besonderen Nachweiskomplexes

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

resultiert, stellt im vorliegenden Fall ein notwendiges technisches Merkmal im Sinne von Artikel 6 PCT und Regel 13 PCT dar.

- 1 -

PCT/EP99/10333

Aventis Research &amp; Technologies GmbH &amp; Co. KG

30. Oktober 2000

H28045PC BÖ/ZW/ps

## Patentansprüche

5 1. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:

- (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezies, die den ersten Marker erkennt,
- (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die sowohl den ersten Marker, wie auch den zweiten Marker erkennt,
- 10 (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker erkennt,
- (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit des ersten und des zweiten Markers in der Probe, durch den Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.

15

2. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:

- (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,
- (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die den ersten Marker, 20 und eine dritte Erkennungsspezie erkennt,
- (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker und die zweite Erkennungsspezie erkennt,
- (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit des ersten und des zweiten Markers in der Probe, durch den Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.

25

3. Nachweisverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Erkennungsspezien, die weitere Marker erkennen, in weiteren Behandlungsschritten eingesetzt werden.
- 5 4. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Erkennungsspezie, vorzugsweise die erste Erkennungsspezie, an einen Träger immobilisiert wird.
- 10 5. Nachweisverfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus einem festen oder gelartigem Material, insbesondere Chipmaterial und/oder dünne Schichten des Materials, vorzugsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien oder (bio)molekulare Filamente, insbesondere Cellulose oder Gerüstproteine.
- 15 6. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Erkennungsspezie und/oder der Marker eine synthetische Substanz, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat ist, vorzugsweise ausgewählt aus einem Peptid, Peptoid, Protein, Saccharid oder einer Nukleinsäure.
- 20 7. Nachweisverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat ausgewählt ist aus einem Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere aus der extrazellulären Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, einem Antikörper oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere einem Fv-Fragment, einem einzelkettiges Fv-Fragment (scFv) oder einem Fab-Fragment, einem Zellbestandteil, insbesondere einem Lipid, Glycoprotein, Filamentbestandteil, Lectin, Liposom, Mitogen, Antigen, sekundärer Metabolit oder Hapten, einer Zelle, insbesondere einer lymphoide Zelle, oder einem Virus, insbesondere einem Virusbestandteil, vor allem einem Kapsid, oder einem Viroid, oder einem Derivat, insbesondere einem Acetat, oder deren wirksame Teile, oder einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure, insbesondere eine natürliche Nukleinsäure in Form einer
- 25
- 30

DNA oder RNA oder eine nicht-natürliche Nukleinsäure, vorzugsweise p-RNA, p-DNA, PNA oder CNA, oder Hybriden der genannten Substanzen.

8. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennung eines Markers durch eine Erkennungsspezie über nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgt, insbesondere über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen, Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen.  
5
- 10 9. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie markiert ist, insbesondere sind alle Erkennungsspezien markiert, vorzugsweise sind mindestens zwei Erkennungsspezien unterschiedlich markiert.
- 15 10. Nachweisverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung oder radioaktive Markierung, vorzugsweise eine LOCI-Markierung, FRET-Markierung, Fluoreszenz-Quenching-Markierung, SPA-Markierung, Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spinmarkierung ist.  
20
11. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker und/oder das Signal amplifiziert wird.
- 25 12. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis gemäß Schritt (d) des Verfahrens kompetitiv erfolgt.
13. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jeder weitere Marker eine von einer Nukleinsäure

verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.

14. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß der  
5 erste Marker und jeder weitere Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer natürlichen Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.
- 10 15. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure als Marker von einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure als Erkennungsspezie erkannt wird.
- 15 16. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat von einer synthtischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise von einem Antikörper oder einem Antikörperderivat als Erkennungsspezie erkannt wird.
- 20 17. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Erkennungsspezie eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat  
25 ist.
18. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Erkennungsspezie und jede weitere Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder  
30

verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.

19. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.  
5
- 10 20. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer synthetische Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat und einer anderen synthetischen Substanz, einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat ist.
- 15 21. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, einem verschiedenen Naturstoff oder einem verschiedenen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder  
20 Antikörper-Derivat ist.
22. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist  
25
23. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder  
30

doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist, und die dritte Erkennungsspezie eine weitere andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.

5

24. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise aus einem Antikörper oder Antikörper-Derivat, und einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und eine dritte Erkennungsspezie eine weitere andere synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein weiterer anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 15
25. Testsystem zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die die mindestens zwei verschiedenen Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, wobei mindestens zwei der Erkennungsspezien unterschiedlich markiert sind.
- 20
26. Testsystem nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger immobilisiert ist.
- 25
27. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.
- 30

28. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 5
29. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und eine von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 10
- 15
30. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.
- 20
31. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungspezie ein Hybrid aus einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und einer anderen von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.
- 25
32. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 25-31, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Erkennungsspezien zusammengestellt werden.
- 30

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger immobilisiert wird.

5 34. Verwendung des Testsystems nach einem der Ansprüche 25-31 zum Nachweis von An- und/oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe.

35. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 in Form eines Diagnostikums oder eines Analyten.

10

36. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 oder 33 für den Nachweis einer Erkrankung oder für die Umweltanalytik, insbesondere zum Nachweis von Krankheitserregern, Markern von Krankheiten, Toxinen und/oder Allergenen.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

To:  
/ Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing:  
06 July 2000 (06.07.00)

in its capacity as elected Office

International application No.:  
PCT/EP99/10333

Applicant's or agent's file reference:  
H 28045PC

International filing date:  
22 December 1999 (22.12.99)

Priority date:  
23 December 1998 (23.12.98)

Applicant:  
WAGNER, Thomas et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
11 April 2000 (11.04.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra  
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

3379682

# PCT

## COMMUNICATION IN CASES FOR WHICH NO OTHER FORM IS APPLICABLE

### INTENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BÖSL, Raphael  
 Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg,  
 Geissler, Innsbruck  
 Galileiplatz 1  
 D-81679 München  
 ALLEMAGNE

Patent- u. Rechtsanwält  
 Galileiplatz 1, München

23.10.2000

Frist  
 Bear.

1

Date of mailing (day/month/year) 20 December 2000 (20.12.00)
Applicant's or agent's file reference H 28045PC
International application No. PCT/EP99/10333

#### REPLY DUE

see paragraph 1 below

International filing date (day/month/year)  
22 December 1999 (22.12.99)

Applicant  
AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG

1.  REPLY DUE within \_\_\_\_\_ months/days from the above date of mailing
- NO REPLY DUE, however, see below
- IMPORTANT COMMUNICATION
- INFORMATION ONLY

#### 2. COMMUNICATION:

The International Bureau acknowledges receipt, on 23 October 2000 (23.10.00) of substitute sheets in respect of the above-identified international application for the drawings that were received by the receiving Office (RO/EP) on 28 April 2000 (28.04.00) and hereby informs the applicant that the said substitute sheets have not been published since they reached the International Bureau after the completion of technical preparations for international publication.

The applicant's attention is drawn to the fact that the defects under PCT Rule 11, as outlined in Form PCT/RO/106, dated 28 February 2000 (28.02.00), were corrected by the Publications Section of the International Bureau at the time of international publication in such a way that the sheets of the drawings as originally filed and as published on 06 July 2000 (06.07.00), already comply with PCT Rule 11 in this respect.

A copy of this communication has been sent to the receiving Office (RO/EP) for information.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer N. Wagner  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)Date of mailing (day/month/year)  
20 December 2000 (20.12.00)

To:  
**BÖSL, Raphael**  
 Bardelle, Pagenberg, Döst, Rechtsanwälte  
 Altenburg, Geissler, Innsbruck 1, München  
 Galileiplatz 1  
 D-81679 München  
**ALLEMAGNE**

2. Jhd. 2000  
Frist  
Bear.

Applicant's or agent's file reference  
H 28045PC

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/EP99/10333International filing date (day/month/year)  
22 December 1999 (22.12.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant     the inventor     the agent     the common representative

## Name and Address

WAGNER, Thomas  
Römerstrasse 18  
D-65719 Hofheim  
Germany

State of Nationality	State of Residence
DE	DE
Telephone No.	
Faximile No.	
Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person     the name     the address     the nationality     the residence

## Name and Address

WAGNER, Thomas  
Sonnenbühlstrasse 73  
78464 Konstanz  
Germany

State of Nationality	State of Residence
DE	DE
Telephone No.	
Faximile No.	
Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

N. Wagner  
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

003733114

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>H 28045PC</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 10333</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>22/12/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/12/1998</b>
Anmelder <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.  
 Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

wie vom Anmelder vorgeschlagen

keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

/EP 99/ 10333

**Feld III****WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)**

nach Zeile 3 bitte folgenden Text hinzufügen:

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die Verknüpfung von zwei oder mehreren Testergebnissen auf molekularer Ebene im Sinne der Bool'schen Verkettung einen qualitativ sehr guten, einfachen und kostengünstigen Analytentest erlaubt, wobei sich die verschiedenen Testergebnisse untereinander nicht im wesentlichen stören.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10333

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 7	G01N33/58	G01N33/542	G01N33/53	G01N33/543	C12Q1/68
--	-------	-----------	------------	-----------	------------	----------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 18866 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC) 29. Oktober 1992 (1992-10-29)	25-36
A	das ganze Dokument ---	1-24
X	WO 98 23956 A (UNIV LONDON ;TEDDER RICHARD SETON (GB)) 4. Juni 1998 (1998-06-04)	25, 26, 28, 32-36
A	das ganze Dokument -----	1-24

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

6. Juni 2000

11/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP/99/10333

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9218866 A	29-10-1992	AU 1911592 A CA 2107899 A EP 0579767 A FI 934438 A JP 6507021 T NO 933582 A US 5851776 A	17-11-1992 11-10-1992 26-01-1994 04-11-1993 04-08-1994 10-12-1993 22-12-1998
WO 9823956 A	04-06-1998	KEINE	

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>H28045PC Bö/sa</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP99/10333</b>	Internationales Anmeldedatum(Tag/Monat/Jahr) <b>22/12/1999</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>23/12/1998</b>

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  
**G01N33/58**

Anmelder

**AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO...et al.**

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 8 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I     Grundlage des Berichts
- II     Priorität
- III     Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV     Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V     Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI     Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII     Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII     Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags <b>11/04/2000</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>24.11.2000</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Hoesel, H Tel. Nr. +49 89 2399 8693



**INTERNATIONALER VORLAUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-13                    ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-36                    eingegangen am                    31/10/2000 mit Schreiben vom            30/10/2000

**Zeichnungen, Blätter:**

1/5-5/5                ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**INTERNATIONALER VORLAUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

- Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 36 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1 - 24 Nein: Ansprüche 25 - 36
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 36 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-5,635,352

D2: WO-A-98/23956

**SEKTION V:**

1. Aufgrund der Klarstellung, daß die "Marker" zu analysierende Bestandteile der Probe darstellen, sind die in den unabhängigen Ansprüchen 1 und 2 dargelegten Verfahren neu gegenüber Testmethoden, die die Bestimmung **eines einzigen Analyten** unter Verwendung eines mehrfach indirekten Nachweises beinhalten (siehe D1, und Sektion VIII, Punkt 4).

Die anspruchsgemäßen Merkmale lassen sich zudem nicht in naheliegender Weise aus dem Stand der Technik gemäß des Recherchenberichts ableiten.

Das Verfahren gemäß der Ansprüche 1 - 24 scheint somit neu zu sein und auf erforderlicher Tätigkeit zu beruhen, und somit die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT zu erfüllen.

2. Anspruch 25 richtet sich auf Testkits, die (mindestens) zwei Erkennungsspezies zur Bindung zweier verschiedener Analyte ("Marker") unter Komplexbildung enthalten, wobei zwei der Bindungsspezies unterschiedlich markiert sind.

Im Gegensatz zu den Ansprüchen 1 und 2 geht aus dem Anspruchwortlaut nicht hervor, welche funktionale Beziehung zwischen den verschiedenen Markern und Erkennungsspezies besteht, z.B. ob jeweils getrennte Komplexe ( $e_1 \times m_1$  bzw.  $e_2 \times m_2$ ) oder ein alle Bestandteile enthaltender Komplex gebildet wird.

Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyte unter Verwendung von für die jeweiligen Analyte spezifische, und voneinander unterscheidbare Erkennungsreagenzien, sind aus dem Stand der Technik bekannt (s. D2, S. 1, Z. 25 - 28, S. 2, Z. 13 - 26 und S. 4, Z. 21 - 23). Der Fachmann würde die Zusammensetzung der dafür notwendigen Reagenzien, insbesondere der Erkennungsspezies in Form von Testkits als naheliegende Maßnahme erachten. Derartige Kits

würden in den Schutzbereich der vorliegenden, breiten Ansprüche 25 und 26 fallen.

Die genannten Ansprüche erfüllen somit nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT (siehe auch Sektion VIII, Punkt 5).

Der Einwand bezieht sich gleichermaßen auf die abhängigen Ansprüche 28, 32 und 33, deren Merkmale in D2 vorbeschrieben sind, sowie auf die Ansprüche 34 - 36, die sich auf die konventionelle Verwendung des naheliegenden Testsystems in bekannten Testverfahren (die gemäß Anspruchswortlaut nicht mit den in Anspruch 1 und 2 genannten Verfahren identisch sein müssen) richten.

3. Die Merkmale der abhängigen Ansprüche 27, 29 - 31 sind aus D2 nicht ableitbar. Berücksichtigung dieser Merkmale in den übergeordneten Ansprüchen führt jedoch nicht zu einem Produkt, das speziell für die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angepaßt wäre, und die vorgegebene Aufgabenstellung lösen könnte.

Die obengenannten Ansprüche genügen somit nicht den Erfordernissen des Artikels 33(3) PCT (siehe auch Sektion VIII, Punkt 6).

### **SEKTION VIII:**

4. Laut Anspruch 1 stellen die als Marker bezeichneten Assaykomponenten zu analysierende Substanzen z.B. in einer klinischen Probe dar. Als solche liegen "Marker" oder genauer ausgedrückt "Analyte" **grundsätzlich in unmarkierter Form und in unbekannter Konzentration** vor. Den beiden vorliegenden Arbeitsbeispielen liegt jedoch die Bestimmung **einer einzigen unmarkierten, und somit als Analyt anzusehenden** Substanz zugrunde. Die Arbeitsbeispiele fallen somit nicht in den Schutzbereich der vorliegenden Ansprüche. Hinsichtlich der verwendeten Reagenzien (die als "Marker 2" bezeichnete Substanz wurde als Fluoreszein-markiertes Derivat und in vorgegebener Konzentration zugesetzt) beschreiben die Beispiele ein Verfahren zur Bestimmung **eines einzigen Analyten** unter Verwendung von mehrfach indirekter Markierung.

Es liegt somit ein Widerspruch zwischen dem experimentellen Teil der Beschreibung und dem Anspruchsgegenstand vor. Die Anmeldung genügt somit nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT.

Verfahren unter Verwendung mehrfach indirekter Markierung und Signalamplifikation sind in D1 vorbeschrieben. Sollte der Begriff "Marker" dahingehend ausgelegt werden, daß er in vorgegebener Menge zugesetzte, und insbesondere markierte Reagenzien umfaßt, deren Funktion genauer mit dem Begriff "Erkennungsspezies" umschrieben wäre, ergäbe sich ein Einwand wegen fehlender Neuheit gegenüber D1:

Gemäß der beiden vorliegenden Arbeitsbeispiele ist das als "m2" bezeichnete Reagenz kein Analyt, sondern dient als Detektionsmittel, und ist somit hinsichtlich seiner Signalfunktion und Lokalisation im resultierenden Reaktionskomplex als vierte Erkennungsspezies "e4", aufzufassen. Es hat damit identische Funktion wie die Label probe "LP" gemäß der Figuren 7, 8 und 12 in D1.

5. Im Gegensatz zum Verfahren in Anspruch 1 sind im Verfahren gemäß Anspruch 2 **ohne Auswahl spezifischer Markierungsgruppen und -technologien** Teilkomplexe, die nur jeweils einen der (unmarkierten) Analyte enthalten (und somit nicht als positiv auszuwerten wären) nicht von "vollständigen" Komplexen der Konformation e1 x m1 x e2 x e3 x m2 unterscheidbar.

Anspruch 2 scheint somit nicht alle für die erfolgreiche Umsetzung des Verfahrens notwendigen Verfahrensmerkmale und -anpassungen zu enthalten. Er entspricht somit nicht den Erfordernissen von Art. 6 PCT.

6. Im Gegensatz zu den Ansprüchen 1 und 2 enthalten die Kitansprüche 25 und 26 keinerlei Spezifikationen hinsichtlich der Wechselbeziehung der Erkennungsspezies mit den verschiedenen Markersubstanzen. Die demgemäß beanspruchten Testkits sind somit nicht erkennbar speziell für die erfindungsgemäßen Verfahren angepaßt (siehe auch Sektion V, Punkt 2 und 3).

Die spezielle Wechselbeziehung der beiden Erkennungsspezies mit den übrigen Assaykomponenten, die in der Ausbildung eines besonderen Nachweiskomplexes

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10333

resultiert, stellt im vorliegenden Fall ein notwendiges technisches Merkmal im Sinne von Artikel 6 PCT und Regel 13 PCT dar.

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

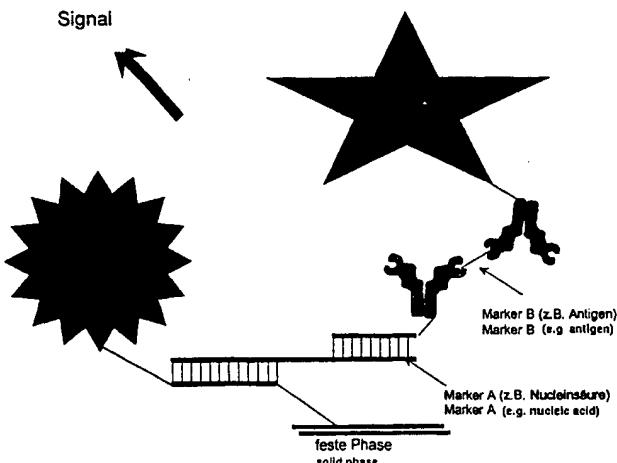
21

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/39581
G01N 33/53		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP99/10333	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	22. Dezember 1999 (22.12.99)	
(30) Prioritätsdaten:	198 59 912.9 23. Dezember 1998 (23.12.98) DE	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG (DE/DE); D-65929 Frankfurt am Main (DE).	
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	WAGNER, Thomas (DE/DE); Römerstrasse 18, D-65719 Hofheim (DE). WINDHAB, Norbert (DE/DE); Akazienstrasse 28, D-65795 Hattersheim (DE).	
(74) Anwalt:	BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isnbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).	

(54) Title: TEST SYSTEM FOR DETECTING DIFFERENT MARKERS, AND PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: TESTSYSTEM ZUR ERKENNUNG VERSCHIEDENER MARKER, SEINE HERSTELLUNG SOWIE VERWENDUNG



(57) Abstract

The invention relates to a test system containing at least two detection species, which detect at least two different markers by forming a complex. The invention also relates to the production of said test system and to its use in a suitable detection method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem, enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, seine Herstellung sowie Verwendung in einem geeigneten Nachweisverfahren.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Testsystem zur Erkennung verschiedener Marker, seine Herstellung  
10 sowie Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, seine Herstellung sowie Verwendung in einem geeigneten Nachweisverfahren.

Die Anwendungsbereiche von Testsystemen, wie z. B. Diagnostika, sind in der Biologie, Biochemie, Medizin und Pharmakologie weit verbreitet. Vor allem in der Medizin ist eine zuverlässige und eindeutige Diagnose von Krankheiten, wie z. B. virale Infektionen oder Krebs, 20 von außerordentlicher Wichtigkeit zur Steigerung der Lebensqualität, da nur durch ein frühzeitiges Erkennen einer Krankheit eine rechtzeitige und effektive Behandlung erfolgen kann. Basierend auf der Erkennung krankheitsspezifischer Marker bzw. Liganden, wie z. B. Nukleinsäuresequenzen, Proteine oder Antigene, wird der Erreger oder die Krankheit in der biologischen Probe nachgewiesen. Weit verbreitet sind Diagnostiktests, in denen jeweils ein 25 Marker oder eine Klasse von Markern nachgewiesen wird, wie z. B. bei ELISA oder bei Amplifizierungsmethoden, wie PCR, b-DNA, Southern-, Western- oder Northern-Blotting. Die verwendeten Detektionsarten reichen von einfachen Färbungsmethoden und kalorimetrischen Methoden über Fluoreszenz-Energy-Transfer (FRET) und Fluoreszenz-Quenching bis zum Scintillation Proximity Assay (SPA).

30

Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von nur einem Marker bzw. einer Markerklasse ist, daß leicht fälschlicherweise positive Testergebnisse entstehen, die auch zu falschen Rückschlüssen bezüglich einer bestimmten Krankheit führen. Oftmals muß daher ein zweiter

Test oder noch weitere Tests auf den gleichen oder komplimentären Analyten durchgeführt werden, um eine zuverlässige Aussage bezüglich krank/gesund treffen zu können. Dies führt zu mehreren Tests, deren Ergebnisse miteinander zu vergleichen sind, was zugleich aufwendig und kostenintensiv ist.

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, qualitativ bessere, weniger aufwendigere und kostengünstigere Analytentests als die bereits bekannten zu entwickeln.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Verknüpfung von zwei oder mehreren 10 Testergebnissen auf molekularer Ebene im Sinne der Bool'schen Verkettung einen qualitativ sehr guten, einfachen und kostengünstigen Analytentest erlaubt, wobei sich die verschiedenen Testergebnisse untereinander nicht im wesentlichen stören.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:

- 15 (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,  
(b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die sowohl den ersten Marker, wie auch den zweiten Marker erkennt,  
(c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker  
20 erkennt,  
(d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.

Des Weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Nachweisverfahren enthaltend 25 folgende Schritte:

- (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,  
(b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die den ersten Marker, und eine dritte Erkennungsspezie erkennt,

- (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker und die zweite Erkennungsspezie erkennt.
- (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.

5

Zur Erhöhung der Spezifität ist es in einer weiteren Ausführungsform vorteilhaft, daß weitere Erkennungsspezien, die weitere Marker erkennen, in weiteren Behandlungsschritten eingesetzt werden, was bei einer Erweiterung auf n-Liganden mit n gleich einer natürlichen Zahl n + 1 Erkennungsspezien zur Folge hat.

10

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird das Nachweisverfahren in homogener, teilhomogener (modularer) oder immobilisierter Form durchgeführt. Bei einer homogenen Ausführungsform werden schrittweise die Bindungsergebnisse erzeugt und der sich eventuell gebildete Komplex in einem sogenannten Proximity Assay nachgewiesen. Dabei werden die erste und die letzte Komponente vorzugsweise so markiert, daß sie nur bei gegenseitiger Nähe ein Signal erzeugen können. Bevorzugte Detektionsverfahren sind z. B. LOCI (Ullmann, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426), Fluoreszenz-Energy-Transfer (FRET) Cardullo, R.A. (1992) in „Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules“, 414-423, Springer Verlag), Fluoreszenz-Quenching (Ladokhin, A.S. (1997) „Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide“, Methods-Enzymol., 278, 462-473) oder Scintillation Proximity Assay (SPA) (Picardo, M. & Hughes, K.T. (1997) „Scintillation proximity assays. High Throughput Screening“; Ed. Devlin, J. P.; Verlag Dekker, New York, N.Y., 307-316).

25 Bei einer teilhomogenen oder modularen Ausführungsform werden die Bindungsergebnisse schrittweise und in Lösung erzeugt, und, sobald der Komplex sich ausgebildet hat, über eine der Komponenten an einen festen Träger gebunden. Der sich bildende Komplex wird durch eine Markierung, insbesondere eine nicht-radioaktive Markierung oder radioaktive Markierung, vorzugsweise über eine Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spinmarkierung nachgewiesen (Kessler, C. (Ed.) Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules (1992), Springer Verlag, 414-423).

Bei einer immobilisierten Ausführungsform wird eine Erkennungsspezie, vorzugsweise die erste Erkennungsspezie an einen festen Träger gebunden und nachfolgend durch schrittweise Zugabe der weiteren Komponenten der Komplex aufgebaut. Die Markierung erfolgt vorzugsweise nach gleichen oder ähnlichen Methoden wie bei der teilhomogenen Ausführungsform.

Als Träger für die Immobilisierung eignen sich vor allem festes oder gelartiges Material, insbesondere Chipmaterial und/oder dünne Schichten des Materials, vorzugsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien oder (bio)molekulare Filamente, insbesondere Zellulose oder Gerüstproteine.

Die in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren eingesetzten Erkennungsspezien und/oder Marker sind insbesondere eine synthetische Substanz, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Peptid, Peptoid, Protein, Saccharid oder eine Nukleinsäure. Besonders bevorzugt sind beispielsweise ein Rezeptor oder ein funktioneller Teil davon, insbesondere ein funktioneller Teil, der aus der extrazellulären Domäne eines membran-ständigen Rezeptors entstammt, ein Antikörper oder ein funktioneller Teil davon, insbesondere ein Fv-Fragment (Skerra & Plückthun (1988), Science 240, 1038), ein einzelkettiges Fv-Fragment (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 5879) oder ein Fab-Fragment (Better et al. (1988), Science 240, 1041), ein Aptamer, beispielsweise ein DNA- oder RNA-Aptamer oder Derivate davon, beispielsweise mit in der Nukleinsäurechemie üblichen Schutzgruppen versehene Aptamere, ein Zellbestandteil, insbesondere ein Lipid, Glykoprotein, Filamentbestandteil, Lektin, Liposom, Mitogen, Antigen, sekundärer Matabolit oder Hapten, eine Zelle, insbesondere eine lymphoide Zelle, oder ein Virus, insbesondere ein Virusbestandteil, vor allem ein Kapsid, oder ein Viroid oder ein Derivat, insbesondere ein Acetat, oder deren wirksame Teile, oder eine einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, insbesondere DNA, RNA, p-RNA (Pitsch, S. et al., Helv. Chim. Acta. (1993), 76, 2161; Pitsch, S. et al., Helv. Chim. Acta. (1995), 78, 1621), p-DNA (DE 198 37 387.2), PNA (peptidische Nukleinsäure (Nielsen, P.E. et al. (1991) Science, 254, 1497), CNA (Aminocyclohexylnukleinsäure; PCT/EP98/06002) oder ein Aptamer (siehe z. B. Bock, L.C. et al. (1992) Nature, 355, 564) oder Hybride der genannten Substanzen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung zählen Aptamere aufgrund ihrer Bindungseigenschaften an spezifische von Nukleinsäuren unterschiedliche Moleküle, wie z. B. Proteine, nicht zu den Nukleinsäuren, sondern zu Antikörper-Derivaten. Bevorzugt sind DNA-Aptamere oder RNA-Aptamere.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren einschließlich Aptamere können auch modifiziert sein. Hierzu sind die dem Fachmann aus der Nukleinsäurechemie bekannten Methoden anwendbar. Bevorzugt sind Modifikationen, die zu einer Stabilisierung der Nukleinsäuren führen (siehe z. B. Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90. 543, No. 4).

10

Üblicherweise erfolgt die Erkennung eines Markers durch eine Erkennungsspezie über nicht-kovalente Wechselwirkungen, insbesondere über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stape-lungen, Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen. Beispielsweise wird eine Nukleinsäure als Marker durch eine vollständig oder teilweise komplementäre Nukleinsäure erkannt oder eine synthetische Substanz, wie z. B. eine Chemikalie, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffsderivat als antigene Stoffe werden von einem entsprechenden Antikörper oder Antikörper-Derivat erkannt. Gemäß dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren können die Marker jeder beliebigen Substanzklasse angehören, vorzugsweise jedoch aus mindestens zwei verschiedenen.

15  
20

Gemäß dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren ist des Weiteren mindestens eine Erkennungsspezie markiert, vorzugsweise sind alle Erkennungsspezien markiert, vor allem sind mindestens zwei Erkennungsspezien unterschiedlich markiert. Wie bereits oben näher erläutert, kann die Markierung je nachdem ob es sich um eine homogene, teilhomogene (modulare) oder immobilisierte Ausführungsform handelt, nicht-radioaktiv oder radioaktiv sein, vorzugsweise LOCI, FRET, Fluoreszenz-Quenching, SPA, eine Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spin-Markierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Marker und/oder das Signal amplifiziert werden, was zu einer Erhöhung der Sensitivität des Nachweisverfahrens führt. Die Amplifizierung des Markers betrifft insbesondere die Amplifizierung von Nukleinsäuren, beispielsweise durch PCR, NASBA, LCR, SDA, Q $\beta$ -Replikation oder RT-PCR (Kessler, C.

(1992) supra). Die Signalamplifizierung wird beispielsweise durch sog. Cross-Linking von Bindungspartnern, Antikörper- oder Nukleinsäure-Bäumen (z. B. b-DNA), katalytische Substratumssetzung (z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase,  $\beta$ -Galaktosidase) oder Signalkaskaden erreicht.

5

Neben der genannten in vitro Amplifizierung ist auch eine in vivo Amplifizierung, z. B. Detektion von r-RNA, indirekte Detektion von Antigenen, möglich.

Grundsätzlich kann man die Marker in zwei Klassen aufteilen. Bei sog. Positivmarkern wird  
10 das Fehlen dieser Marker nachgewiesen, z. B. über das Fehlen eines Signals. Positive Marker beziehen sich im allgemeinen auf in einem gesunden Organismus vorhandene Marker, z.B. m-RNA. Als negative Marker werden im allgemeinen die Substanzen eines Pathogens oder eines kranken Organismus bezeichnet, der über das erfundungsgemäße Nachweisverfahren bestimmt werden kann.

15

Gemäß dem erfundungsgemäßen Nachweisverfahren können entweder zwei oder mehrere negative, zwei oder mehrere positive oder zwei oder mehrere positive und negative Marker nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt somit entweder über das Auftreten oder über das Fehlen eines Signals. Ebenso ist eine Verdrängung eines Signals z.B. durch das Verdrängen  
20 eines Moleküls aus einem Komplex oder aus seiner bindenden Konformation (z.B. Molecular Beacons, S. Tyaki, Kramer F. R., Nature Biotechnology 14, 303-308, 1996; R.P. Ekins, Clinical Chemistry, 44/9, 2015-2030, 1998) in einem kompetitiven Assay möglich. Hierzu wird eine Substanz dem Testsystem zugegeben, die einen der nachzuweisenden Marker verdrängt,  
25 wobei der aus Markern und Erkennungsspezien aufgebaute Molekülkomplex und damit auch das damit verbundene Signal verschwindet. Über eine Titration lässt sich somit auf einfache Art und Weise die Konzentration des verdrängten Markers bestimmen.

Das erfundungsgemäße Nachweisverfahren kann nun in mindestens einer der folgenden alternativen Ausführungsformen vorliegen, die besonders bevorzugt sind:

30

1. Mindestens ein Marker ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jedere weitere Marker ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, Naturstoff oder Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen.

5

2. Der erste Marker und jeder weitere Marker ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen.

10

3. Eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure als Marker wird von einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure als Erkennungsspezie erkannt.

15

4. Eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat wird von einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise von einem Antikörper oder einem Antikörper-Derivat als Erkennungsspezie erkannt.

20

5. Mindestens eine Erkennungsspezie ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Erkennungsspezie ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder ein Antikörper-Derivat.

25

6. Die erste Erkennungsspezie und jede weitere Erkennungsspezie ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelstränge oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder ein Antikörper-Derivat.

30

7. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure.

5

8. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat und einer anderen synthetischen Substanz, einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat.

- 10 9. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, einem verschiedenen Naturstoff oder einem verschiedenen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.

15

10. Eine erste Erkennungsspezie ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, eine zweite Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise einem Antikörper oder Antikörper-Derivat.

20

11. Eine erste Erkennungsspezie ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure, eine zweite Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure, und die dritte Erkennungsspezie ist eine weitere andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure.

25

12. Eine erste Erkennungsspezie ist eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat, eine zweite Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff

30

oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise einem Antikörper oder Antikörper-Derivat, und einer anderen synthetischen Substanz einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat, vorzugsweise einem anderen Antikörper oder Antikörper-Derivat, und eine dritte Erkennungsspezie ist eine weitere andere synthetische Substanz, ein weiterer anderer Naturstoff oder ein weiteres anderes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein weiterer anderer Antikörper oder ein weiteres anderes Antikörper-Derivat.

- 5
- Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Testsystem enthaltend mindestens
- 10 zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen, vorzugsweise die oben bereits beschriebenen Erkennungsspezien bzw. Marker. In einer bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger, wie vorzugsweise oben bereits näher beschrieben, immobilisiert.
- 15 Das erfindungsgemäße Testsystem kann in folgenden bevorzugten Ausführungsformen eingesetzt werden:
- 20
1. Mindestens eine Erkennungsspezie ist eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und mindestens eine andere Erkennungsspezie ist eine andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure.

25

  2. Mindestens eine Erkennungsspezie ist eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat, und mindestens eine andere Erkennungsspezie ist eine andere von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.

30

  3. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer

Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörperderivat.

4. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure.
5. Mindestens eine Erkennungsspezie ist ein Hybrid aus einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat und einer anderen von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat.

15

Das erfindungsgemäße Testsystem läßt sich beispielsweise dadurch herstellen, daß die für die einzelnen Ausführungsformen notwendigen Erkennungsspezien zusammengestellt werden, bzw. daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger, wie oben bereits vorzugsweise beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren immobilisiert wird.

20

Das erfindungsgemäße Testsystem läßt sich in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren, wie oben näher beschrieben, einsetzen. Insbesondere dient es zum Nachweis von An- und/oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe. Vorzugsweise liegt es in Form eines Diagnostikums oder eines Analyten vor. Es dient daher insbesondere für den Nachweis von Erkrankungen oder für die Umweltanalytik, insbesondere zum Nachweis von Toxinen und/oder Allergenen.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

## BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

Fig. 2 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (Antigene A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

Fig. 3 zeigt schematisch den Nachweis von zwei Analyten (Nukleinsäure A und B) in einem Assay in der immobilisierten Ausführungsform.

Fig. 4 zeigt schematisch den Komplex aus Markern und Erkennungsspezien gemäß Beispiel 1.

15

Fig. 5 zeigt schematisch den Komplex aus Markern und Erkennungsspezien gemäß Beispiel 2.

## BEISPIELE

20

**Gleichzeitige Detektion einer Desoxyribonucleinsäure und eines markierten Antikörper-Antigens.**

Ausgangsverbindungen:

25 Die für das Beispiel benötigten Reagenzien, wie Texas-Red® markiertes Oligonukleotidkonjugat (24-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 1), ein biotinyliertes Oligonukleotidkonjugat (24-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 3); ein synthetisches Oligonukleotid (57-mer DNA; Fa. Interactiva; DNA 2), das zu den beiden anderen DNAs komplementäre Sequenzen besitzt, Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab')<sub>2</sub> (Ziege; Fa. Rockland) und ein Fluorescein-

markiertes human IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Fa. Rockland) als Antigen, sind alle käuflich erhältlich

Reagenz	Spezifikation
DNA 1 (Erkennungsspezie 1)	TexasRed-5'-AAA-TGC-ATG-TCG-TCG-TGA-TGT-AAA-3'
DNA 2 (Marker 1)	5'-ATT-GTC-ATA-ATC-ATC-TTG-AGA-CGC-TTT-TTT-TTT- TTT-ACA-TCA-CGA-CGA-CAT-GCA-TTT-3'
DNA 3 (Erkennungsspezie 2)	Biotin-5'-GCG-TCT-CAA-CAT-GAT-TAT-GAC-AAT-3'
Antikörper (Erkennungsspezie 3)	Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab') <sub>2</sub> (Ziege)
Antigen (Marker 2)	Fluorescein-markiertes Human IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment

5 Tabelle 1: verwendete Erkennungsspezien und Marker

### Beispiel 1

- 10 1 nmol TexasRed-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 1), 1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 3) und 1 pmol des 57-meren Oligonucleotids (DNA 2 wurden in jeweils 150 µl Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,02 % SDS) aufgenommen. Anschließend wurde für 30 min auf 60 °C erwärmt, miteinander vermischt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Man ließ auf Raumtemperatur (RT) abkühlen, addierte 1 nmol des Streptavidin-anti-Human-IgG F(ab')<sub>2</sub>-Konjugats und 1 nmol des Fluorescein-markierten IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragments und ließ über Nacht bei RT stehen. Der sich bildende Komplex wurde durch eine gelbe Bande in einem nicht-denaturierenden Gel (15%-iges TEB-Gel, Fa. BioRad) nachgewiesen.
- 15

Beispiel 2:

1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 1), 1 nmol Biotin-markiertes Oligonucleotidkonjugat (DNA 3) und 1 pmol des 57-meren Oligonucleotids (DNA 2) wurden in jeweils 150 µl Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,02 % SDS) aufgenommen. Es wurde für 5 min auf 60 °C erwärmt, miteinander vermischt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Man ließ auf Raumtemperatur (RT) abkühlen und gab die Lösung auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (Fa. BIOTEZ, Best.-Nr. 040298920). Die überstehende Lösung wurde abpipettiert und der Träger 5x mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Nun addierte man 200 µl einer, bei RT für 2 h vorinkubierten Lösung aus 200 µl Streptavidin-anti-Human-IgG F(ab')<sub>2</sub> (Ziege)-Lösung (1,6 mg/ml) und 40 µl des Fluorescein-markierten IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-Lösung (5,0 mg/ml) und ließ 1-2 h bei RT inkubieren. Die überstehende Lösung wurde wiederum abpipettiert und der Träger 5x mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Durch das Messen der Fluorescenz des Fluoresceins ( $\lambda_{\text{max},A}$ : 494 nm,  $\lambda_{\text{max},E}$ : 525 nm) wurde die Bildung des Komplexes nachgewiesen.

Reagenz	Spezifikation
DNA 1 (Erkennungsspezie 1 <sup>+</sup> )	Biotin-5'-AAA-TGC-ATG-TCG-TCG-TGA-TGT-AAA-3'
DNA 2 (Marker 1)	5'-ATT-GTC-ATA-ATC-ATC-TTG-AGA-CGC-TTT-TTT-TTT- TTT-ACA-TCA-CGA-CGA-CAT-GCA-TTT-3'
DNA 3 (Erkennungsspezie 2)	Biotin-5'-GCG-TCT-CAA-CAT-GAT-TAT-GAC-AAT-3'
Antikörper (Erkennungsspezie 3)	Streptavidin-konjugiertes anti-Human IgG F(ab') <sub>2</sub> (Ziege)
Antigen (Marker 2)	Fluorescein-markiertes Human IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment

Tabelle 2: verwendete Erkennungsspezien und Marker

5

## Patentansprüche

1. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:
  - (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,
  - 10 (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die sowohl den ersten Marker, wie auch den zweiten Marker erkennt,
  - (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker erkennt,
  - 15 (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.
2. Nachweisverfahren enthaltend folgende Schritte:
  - (a) Behandlung einer Probe enthaltend einen ersten und einen zweiten Marker mit einer ersten Erkennungsspezie, die den ersten Marker erkennt,
  - 20 (b) Behandlung der Probe mit einer zweiten Erkennungsspezie, die den ersten Marker und eine dritte Erkennungsspezie erkennt,
  - (c) Behandlung der Probe mit einer dritten Erkennungsspezie, die den zweiten Marker und die zweite Erkennungsspezie erkennt,
  - 25 (d) Nachweis von Anwesenheit oder Abwesenheit eines Komplexes aus den genannten Erkennungsspezien und Markern.
3. Nachweisverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Erkennungsspezien, die weitere Marker erkennen, in weiteren Behandlungsschritten eingesetzt werden.

4. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Erkennungsspezie, vorzugsweise die erste Erkennungsspezie, an einen Träger immobilisiert wird.

5

5. Nachweisverfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus einem festen oder gelartigem Material, insbesondere Chipmaterial und/oder dünne Schichten des Materials, vorzugsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien oder (bio)molekulare Filamente, insbesondere 10 Cellulose oder Gerüstproteine.

10

6. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Erkennungsspezie und/oder der Marker eine synthetische Substanz, ein Naturstoff und/oder ein Naturstoffderivat ist, vorzugsweise ausgewählt aus einem Peptid, Peptoid, Protein, Saccharid oder einer Nukleinsäure.

15

7. Nachweisverfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat ausgewählt ist aus einem Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere aus der extrazellulären Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, einem Antikörper oder einem funktionellen Teil davon, insbesondere einem Fv-Fragment, einem einzelketiges Fv-Fragment (scFv) oder einem Fab-Fragment, einem Zellbestandteil, insbesondere einem Lipid, Glykoprotein, Filamentbestandteil, Lectin, Liposom, Mitogen, Antigen, sekundärer Metabolit oder Hapten, einer Zelle, insbesondere einer lymphoide Zelle, oder einem Virus, insbesondere einem Virusbestandteil, vor allem einem Kapsid, oder einem Viroid, oder einem Derivat, insbesondere einem Acetat, oder deren wirksame Teile, oder einer einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure, insbesondere eine natürliche Nukleinsäure in Form einer DNA oder RNA oder eine nicht-natürliche Nukleinsäure, vorzugsweise p-RNA, p-DNA, PNA oder CNA, oder Hybriden der genannten Substanzen.

20

- 25
8. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennung eines Markers durch eine Erkennungsspezie über nicht-kovalente Wechselwir-

30

kungen erfolgt, insbesondere über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen, Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen.

5 9. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie markiert ist, insbesondere sind alle Erkennungsspezien markiert, vorzugsweise sind mindestens zwei Erkennungsspezien unterschiedlich markiert.

10 10. Nachweisverfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine nicht-radioaktive Markierung oder radioaktive Markierung, vorzugsweise eine LOCI-Markierung, FRET-Markierung, Fluoreszenz-Quenching-Markierung, SPA-Markierung, Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung oder Spinmarkierung ist.

15 11. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker und/oder das Signal amplifiziert wird.

12. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis gemäß Schritt (d) des Verfahrens kompetitiv erfolgt.

20

13. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jeder weitere Marker eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.

25 14. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Marker und jeder weitere Marker eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer natürlichen Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antigen ist.

30

15. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure als Marker von einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure als Erkennungsspezie erkannt wird.  
5
16. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat von einer synthtischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise von einem Antikörper oder einem Antikörperderivat als Erkennungsspezie erkannt wird.  
10
17. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure und jede weitere Erkennungsspezie eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
15
18. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Erkennungsspezie und jede weitere Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure oder alternativ eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
20
19. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.  
25
20. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer synthetische Substanz, einem Natur-  
30

stoff oder einem Naturstoffderivat und einer anderen synthetischen Substanz, einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat ist.

21. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, einem verschiedenen Naturstoff oder einem verschiedenen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
5
- 10 22. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist  
15
- 20 23. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist, und die dritte Erkennungsspezie eine weitere andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.  
25
- 30 24. Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste Erkennungsspezie eine synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, eine zweite Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer synthetischen Substanz, einem Naturstoff oder einem Naturstoffderivat, vorzugsweise aus einem Antikörper oder Antikörper-Derivat, und einem anderen Naturstoff oder einem anderen Naturstoffderivat, vorzugsweise ein anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und eine dritte Erkennungsspezie eine weitere andere

synthetische Substanz, ein Naturstoff oder ein Naturstoffderivat, vorzugsweise ein weiterer anderer Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.

25. Testsystem enthaltend mindestens zwei Erkennungsspezien, die mindestens zwei verschiedene Marker unter Ausbildung eines Komplexes erkennen.  
5
26. Testsystem nach Anspruch 25. dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger immobilisiert ist.
- 10 27. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26. dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere natürliche oder nicht-natürliche, einzelsträngige oder doppelsträngige Nukleinsäure ist.
- 15 28. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26. dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie eine von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und mindestens eine andere Erkennungsspezie eine andere von einer Nukleinsäure verschiedene synthetische Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
20
29. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und eine von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, ein verschiedener Naturstoff oder ein verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
25
30. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen  
30

gen oder doppelsträngigen Nukleinsäure und einer anderen natürlichen oder nicht-natürlichen, einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nukleinsäure ist.

31. Testsystem nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie ein Hybrid aus einer von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist, und einer anderen von einer Nukleinsäure verschiedenen synthetischen Substanz, verschiedener Naturstoff oder verschiedenes Naturstoffderivat, vorzugsweise ein Antikörper oder Antikörper-Derivat ist.  
5
32. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 25-31, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Erkennungsspezien zusammengestellt werden.  
10
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Erkennungsspezie an einen Träger immobilisiert wird.  
15
34. Verwendung des Testsystems nach einem der Ansprüche 25-31 zum Nachweis von An- und/oder Abwesenheit von mindestens zwei verschiedenen Markern in einer Probe.  
20
35. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 in Form eines Diagnostikums oder eines Analyten.  
25
36. Verwendung des Testsystems nach Anspruch 32 oder 33 für den Nachweis einer Erkrankung oder für die Umweltanalytik, insbesondere zum Nachweis von Krankheitserregern, Markern von Krankheiten, Toxinen und/oder Allergenen.

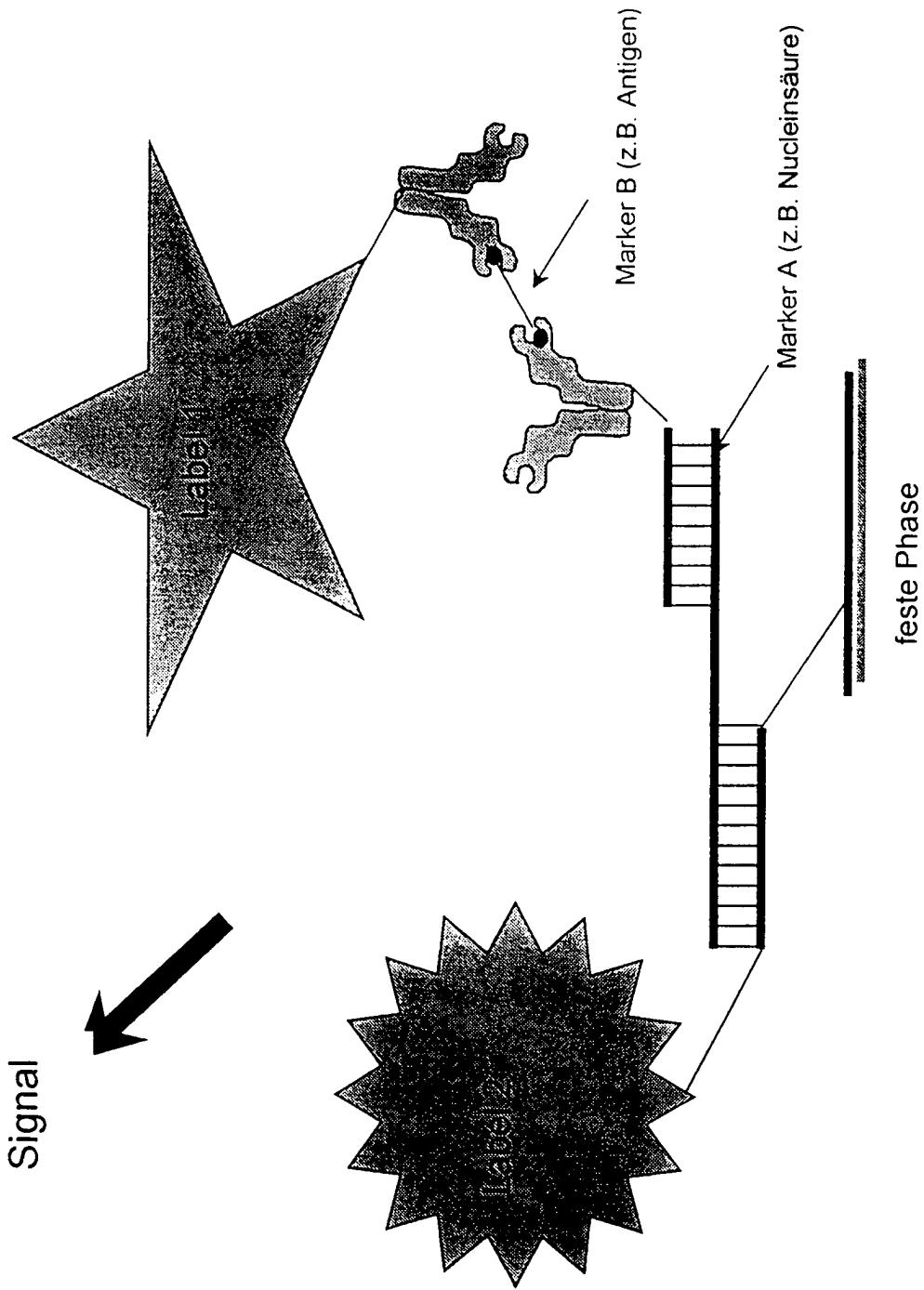
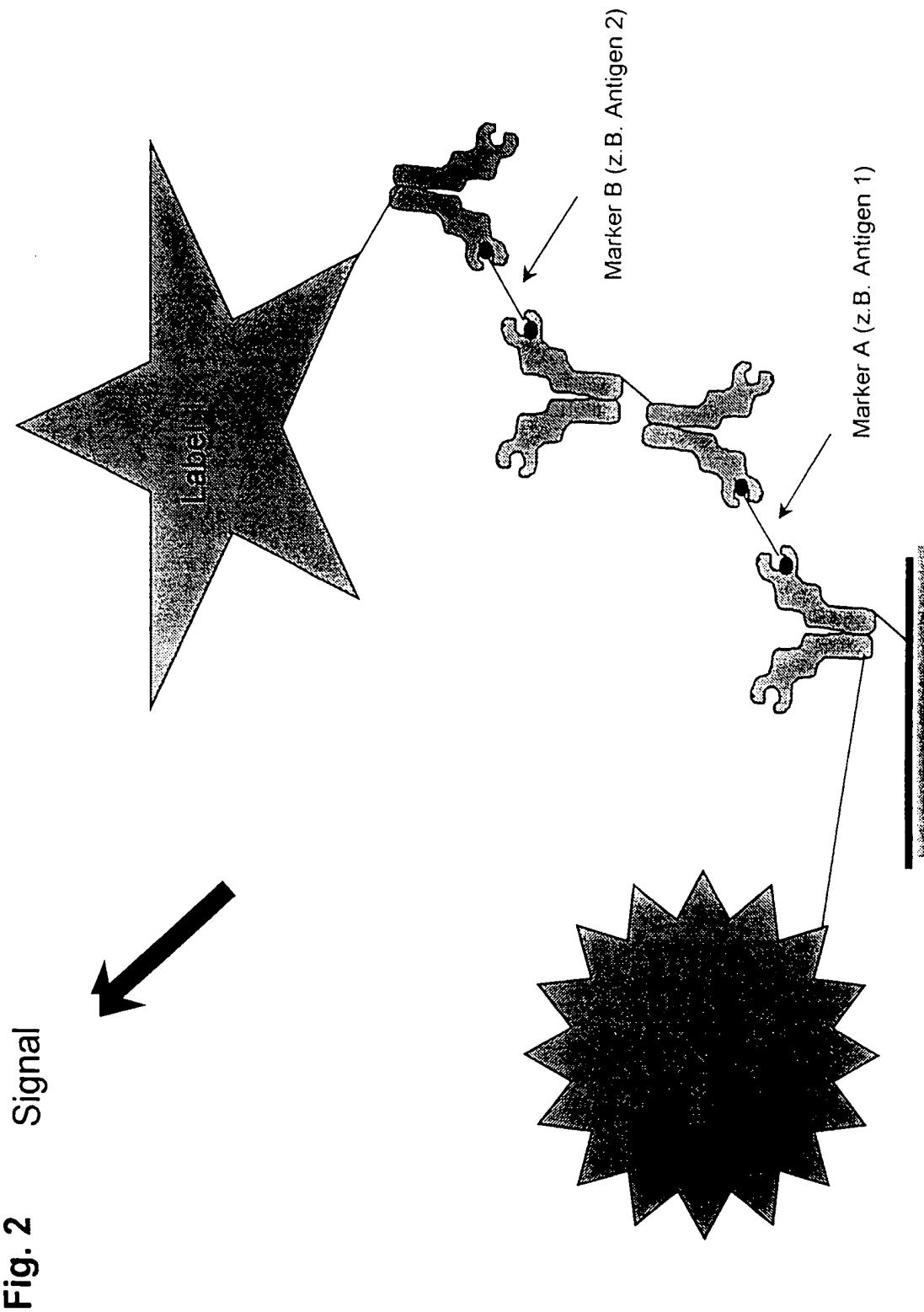
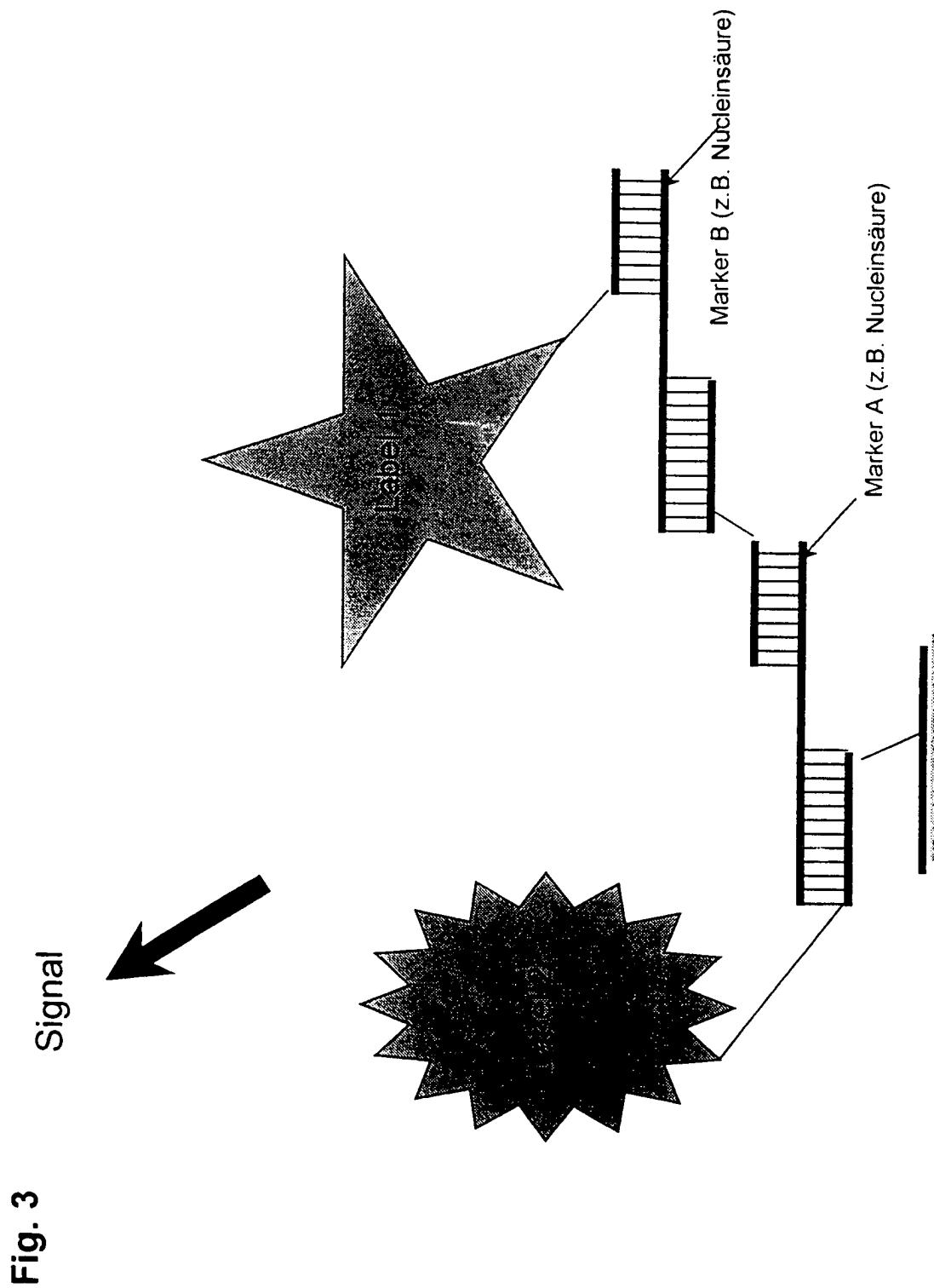
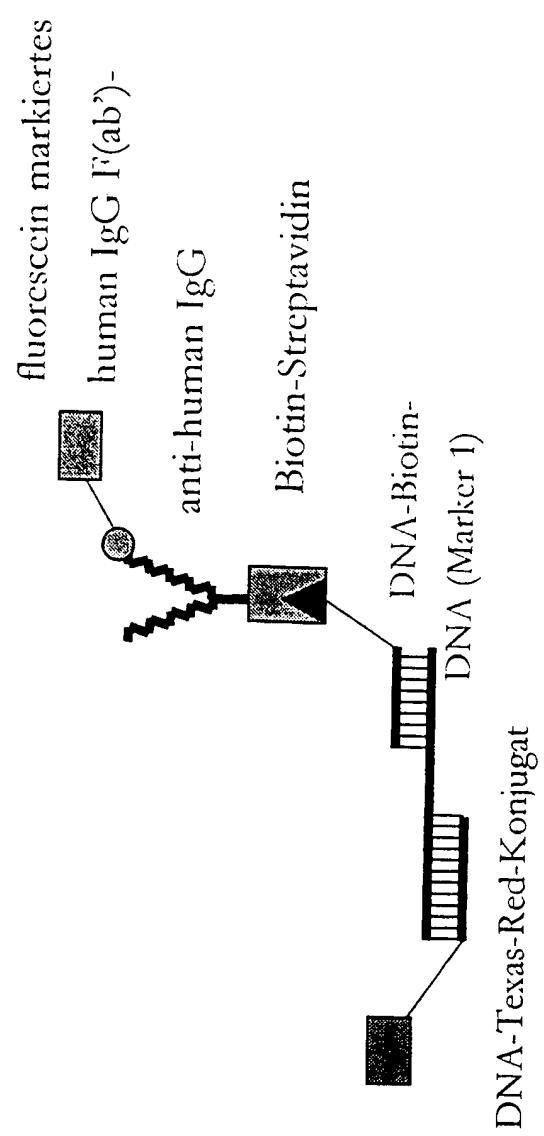


Fig. 1



**Fig. 2** Signal





**Fig. 4**

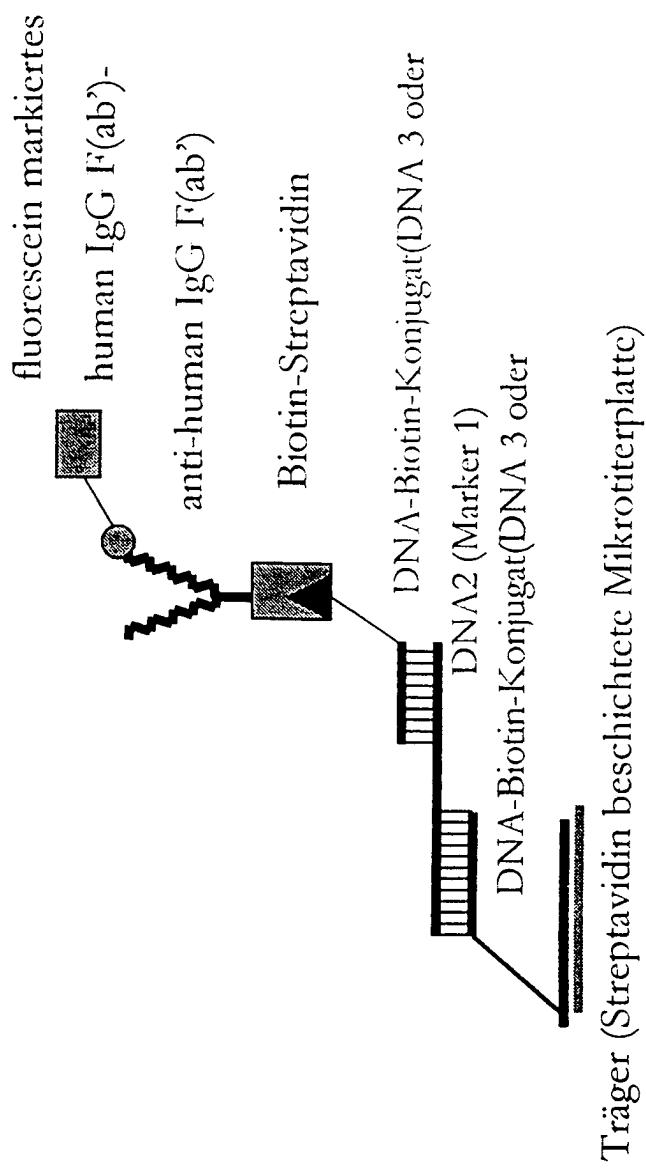


Fig. 5